

血液を使って非アルコール性脂肪性肝炎を 診断する手法の開発

北海道大学

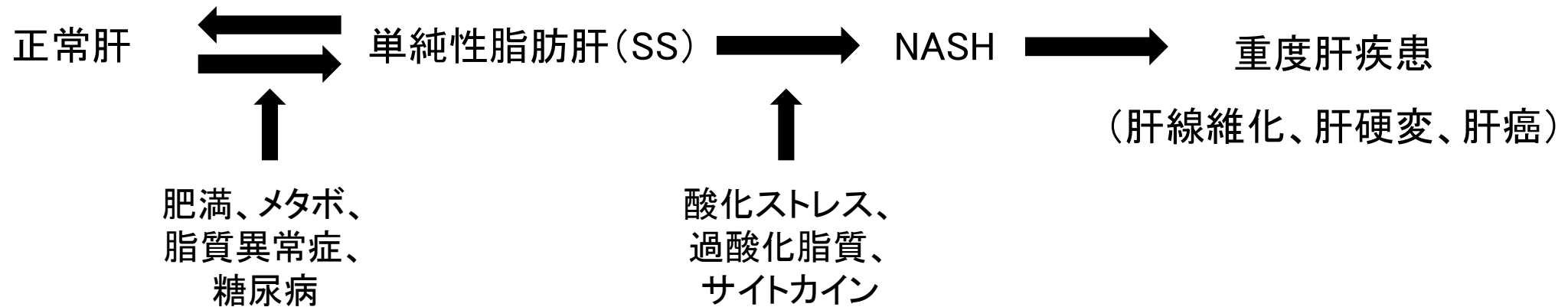
大学院保健科学研究院 病態解析学分野

准教授 櫻井 俊宏

2024年10月10日

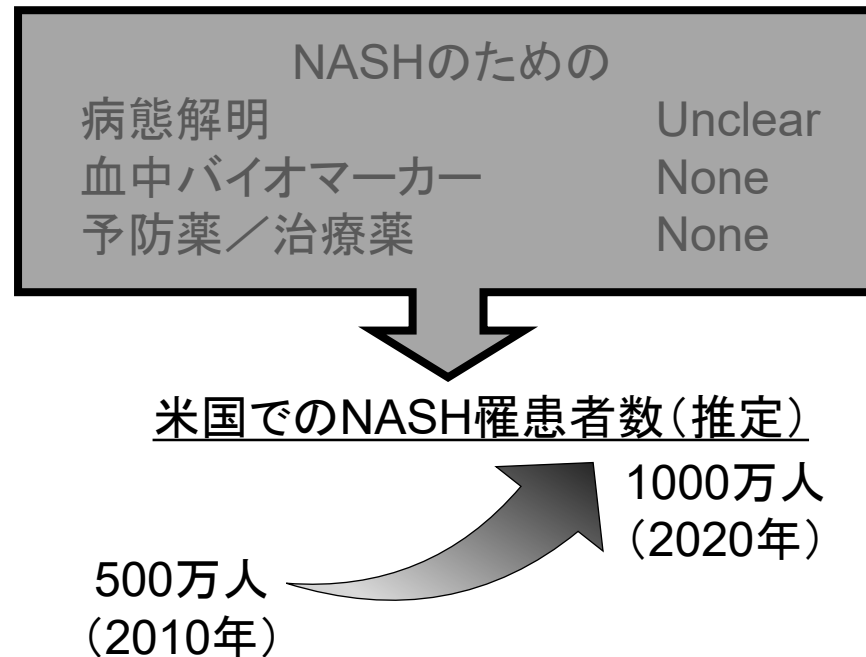
非アルコール性脂肪性肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis, NASH)

- 飲酒歴はないが脂肪性肝障害がみられる病態として、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)が国内外で注目されている。
- 単純性脂肪肝と違う点として、NASHは肝線維化や肝硬変、肝癌に移行する。



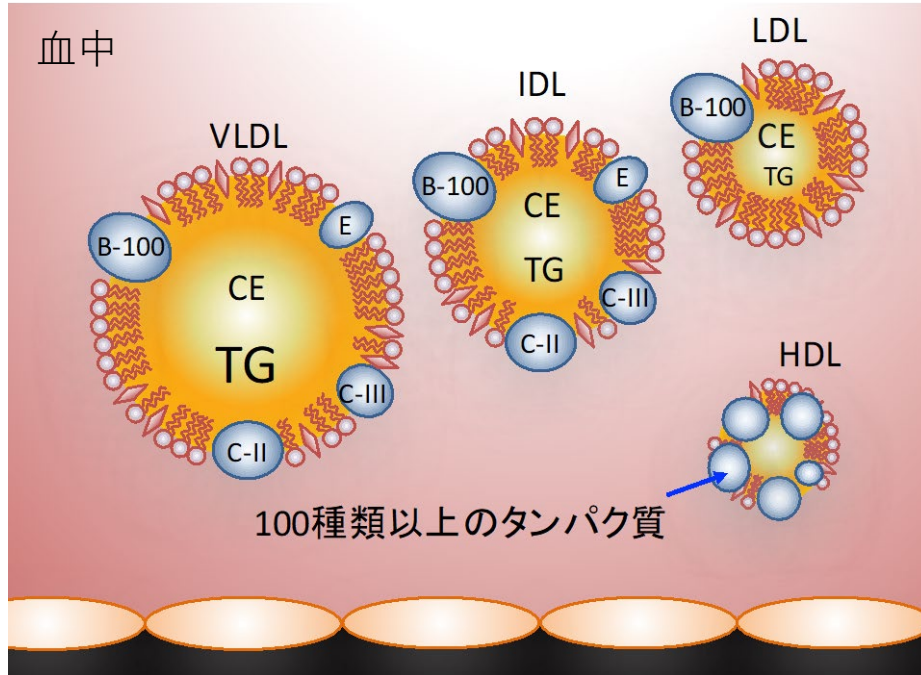
- NASHの確定診断のために肝生検による病理組織診断を行うが、侵襲的である。
- 未だにNASH診断に有効な血液検査法が無く、バイオマーカーが求められている。

疫学調査から見るNASH研究/診断の必要性



過去の報告をもとに作成 (Hamid O, et al., *Ann Hepatol*, 7:100727, 2022.)

HDLの酸化ペプチドの一斉分析



- 近年HDLの質的研究が急増(特に、タンパク質とその機能解析)。
- HDL中のタンパク質の酸化変性はHDLの機能不全を起こす。NASHは酸化ストレス関連性疾患であるので、NASH血清中に酸化HDLは多い可能性を考えた。
- SSに比べてNASHで増加する、安定な酸化HDLの評価法の開発が急務。



- リポタンパク質の中でもHDLはタンパクの種類が多い。タンパク質を標的にしやすい。
- プロテオミクスの手法を保有し、かつ装置も当大学にある(Orbitrap LC-MS/MS)。また酸化修飾ペプチド解析ができるソフトが当大学にある。

HDLの酸化修飾ペプチドを標的に

過去文献

1) NASH患者血清 (NASH含むNAFLD 69名、Control 16名) をproteomics:
15種のproteinがControlとNASHで差異があった。

(apoAIはhitなし。SSvsNASHの鑑別に役立つものは断定できていない)。

Bell N, et al., Hepatology, 2010, 51:111–20.

2) NASH患者血清をproteomics:

Two candidate markers, carbamoyl phosphate synthase 1 and 78kDa glucose-regulated protein, differentially expressed between control and NASH.

(apoAIはhitなし。SSvsNASHの鑑別に役立つものは断定できていない)。

Rodríguez-Suárez E, et al., Proteomics Clin Appl, 2010, 4:362–71.

3) (学会発表抄録) NASH患者HDLをproteomics:

The HDL from NASH patients was significantly enriched with proteins involved in the acute phase response (ceruloplasmin [Cp], serum amyloid amylase, hemopexin, and the complement factor B).

(我々もデータ取得済み。修飾解析までは未実施。)

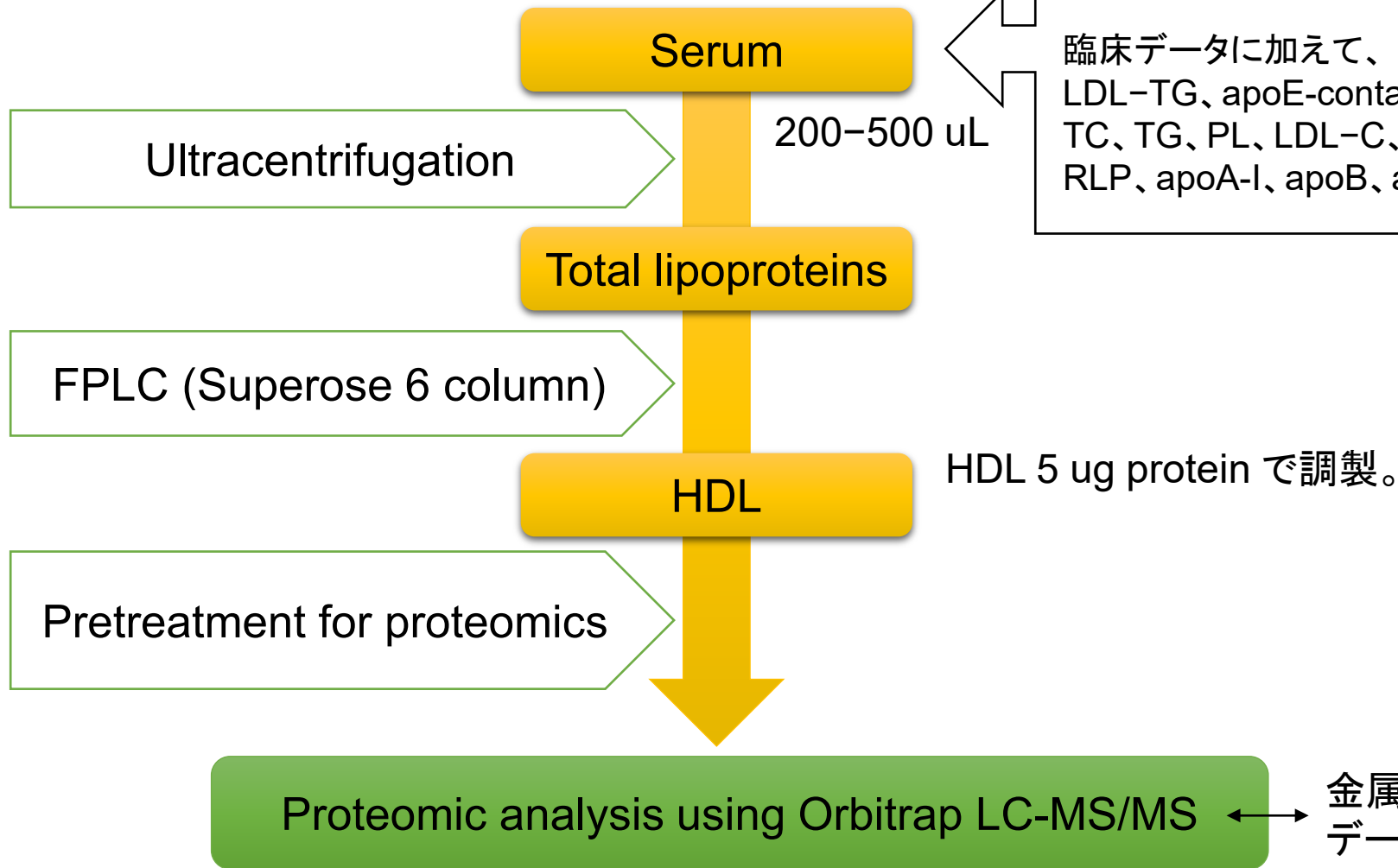
Kasumov T, et al., ATVB conference 2016, abstract.

NASHの血液から分離したHDLの酸化修飾プロテオミクスを実施し、SSとNASHを鑑別できる新しい酸化HDLマーカールを探索することを試みた。

Workflow

検体：
健常者、単純性脂肪肝、NASH(岡山大学)

臨床データに加えて、
LDL-TG、apoE-containing HDL-C、HDL₃、
TC、TG、PL、LDL-C、HDL-C、sdLDL-C、
RLP、apoA-I、apoB、apoEを測定済。



サンプル調製と質量分析の条件

【サンプル調製】

HDL (5 μ g protein)にDTT, IAAを添加してタンパク質の還元アルキル化。

タンパク質をTrypsin処理。

そのサンプルを乾固。

0.1% Trifluoroacetic acid in waterによる再溶解後、Zip-Tipによる脱塩操作。

0.1% Formic acid in waterでサンプル由来のペプチドを溶出し回収し、乾固。

0.1% Formic acid in waterによる再溶解後にOrbitrapによる測定。

【分析条件】

装置:	Thermo EASY-nLC Orbitrap Elite
カラム:	Thermo Acclaim Pep Map 100 (C18)
スプレー部:	NTCC-360 (NIKKYO TECHNOS CO., LTD)
流速:	20 μ L/min
溶媒 (Gradient):	A, 0.1% Formic acid in water; B, 0.1% Formic acid in ACN
注入量:	10 μ L
MS/MS:	FT MS \rightarrow MS/MS by iontrap for top 10 molecules
Alignment:	SEAQUEST
分析時間:	65分

Proteomic analysis by Orbitrap

- 解析時にM, W, Kの酸化修飾を検出・解析 (Proteome Discoverer software)
- HDLにおけるMajor proteinはapoAI。243個のアミノ酸からなる分子量28KDaのタンパク質。

apoAI, partial [Homo sapiens]

GenBank: CAA01253.1

[GenPept Identical Proteins Graphics](#)

>CAA01253.1 apoAI, partial [Homo sapiens]

DEPPQSPWDRVKDLATVYVDVLKDSGRDYVSQFEGSALGKQLNLKLLDNWDSVTST
FSKLREQLGPVTQEFWDNLEKETEGLRQEMSKDLEEVKAKVQPYLDDFQKKWQEE
MELYRQKVEPLRAELQEGARQKLHELQEKLSPLGEEMRDRARAHVDALRTHLAPYS
DELRQRLAARLEALKENGGARLAEYHAKATEHLSTLSEKAKPALEDLRQGLLPVLESF
KVSFLSALEEYTKKLNTQ

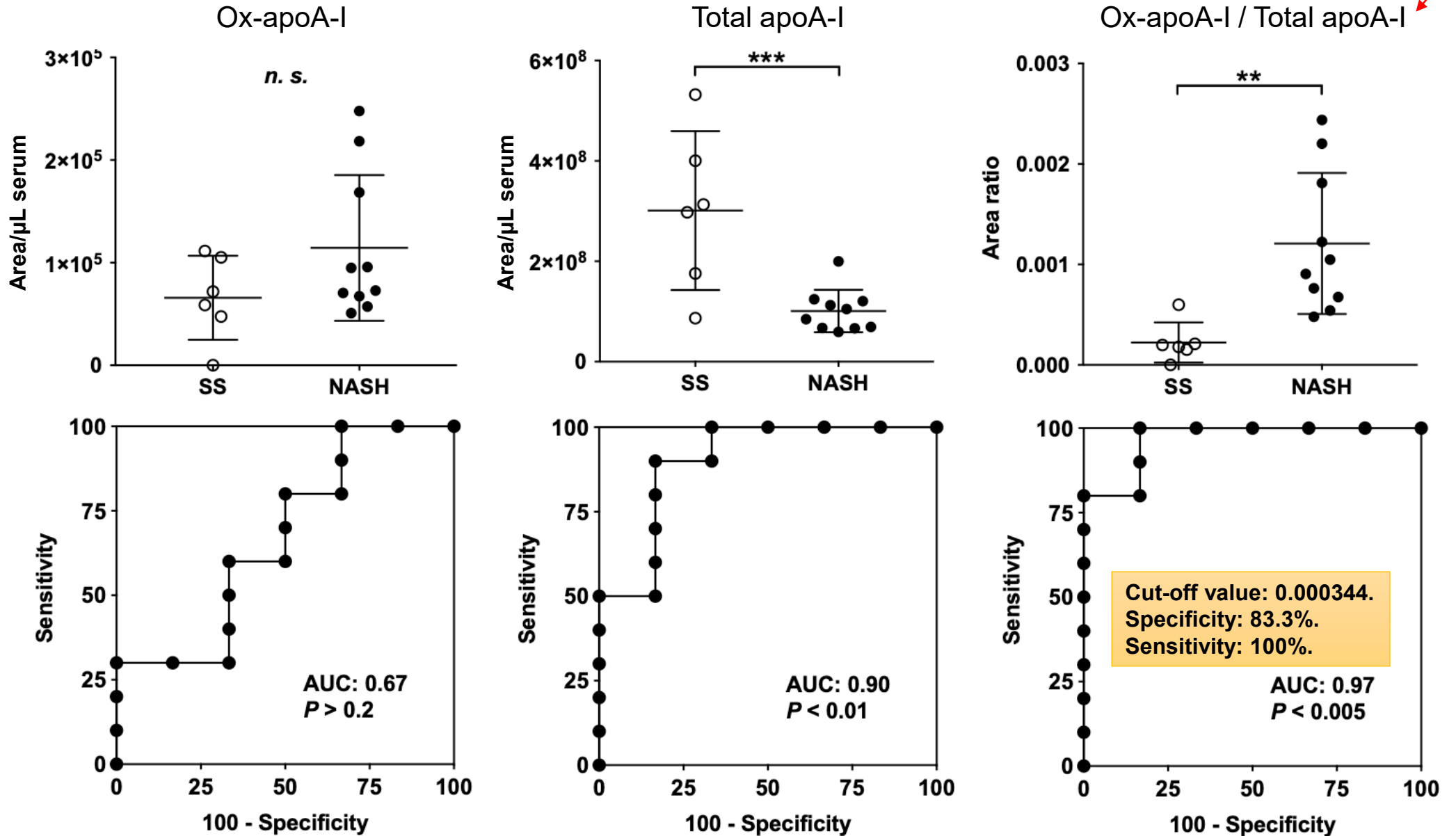
W = Trp72

apoAIのペプチドのEQLGPVTQEFWDNLEKのトリプトファンが二重酸化されたもの(Dioxidation)がNASH患者群で高値傾向にあった。そのpeptideをここではox-apoAI peptideと呼ぶこととする。

臨床検体のHDLにおける酸化修飾ペプチド分析

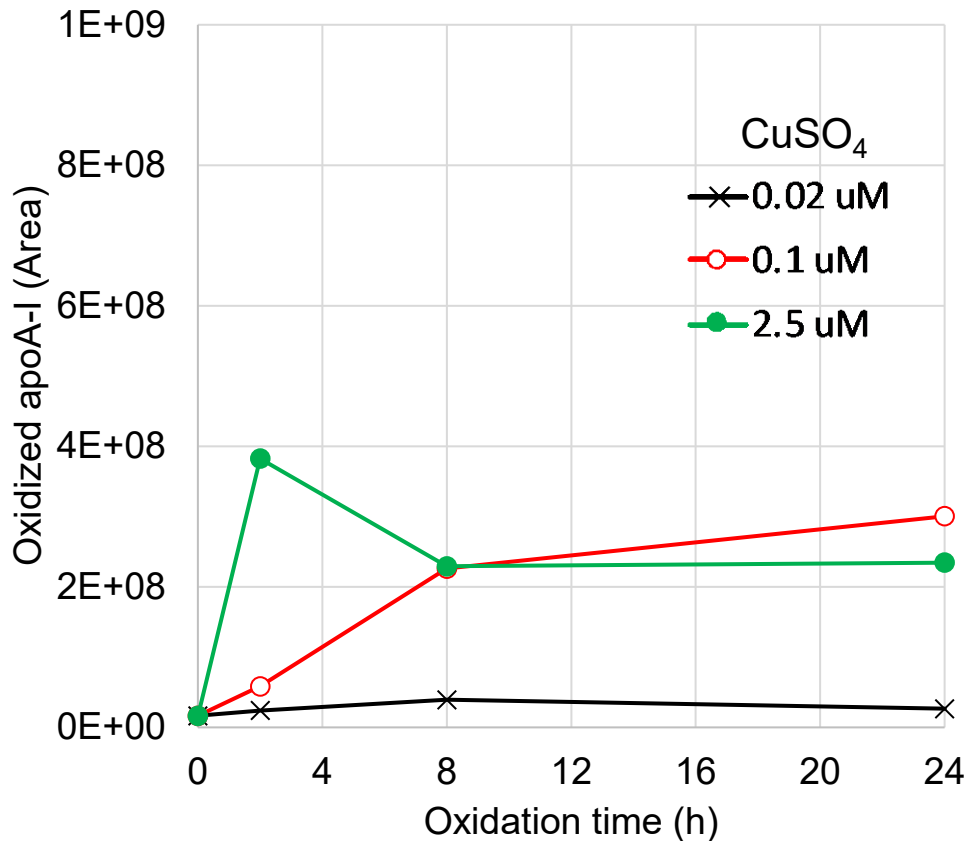
血清量での補正あり (Area/ $\mu\text{L serum}$) = 血中のレベルを想定

NASHではapoAIが酸化を受けている可能性を示唆

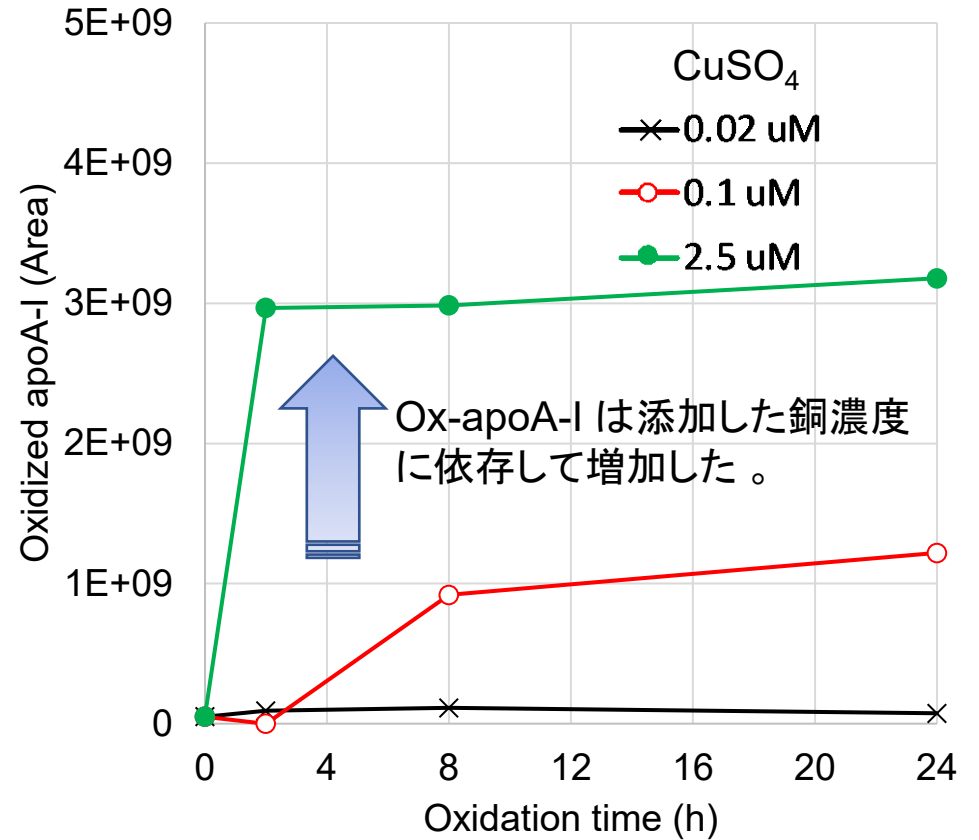


銅酸化HDLにおける酸化修飾ペプチドの増加

ox-apoA-I
EQLGPVTQEFWDNLEK_W11_Oxidation



ox-apoA-I
EQLGPVTQEFWDNLEK_W11_Dioxidation



- Single oxidationのペプチドは酸化が強すぎると減少した→Dioxidationになったために減少したか
- 一度出来たDioxidationタイプは安定の可能性あり→そうであればマーカーとして優れる

ox-apoAI / Total apoAI 比は肝組織学的評価と相関して高値を示す

Histological finding	Score	Number of patients	Mean of ox-apoAI/apoAI	<i>P</i> value
Steatosis	0/1	8	0.00083	0.9486
	2/3	8	0.00085	
Lobular inflammation	0	7	0.00036	0.0165
	1/2	9	0.00121	
Ballooning	0	8	0.00035	0.0035
	1/2	8	0.00133	
Fibrosis	0	7	0.00027	0.0026
	1/2/3/4	9	0.00128	

従来技術とその問題点

- 従来技術の問題点はNASHの確定診断には**肝生検***という侵襲性の高い手法を必要とすることであった。血液を用いる臨床検査による確定診断はなく、性能が不十分である。
- しかし、侵襲性を伴う肝生検を、NASHが疑わしい全ての脂肪肝の患者に適応することはハードルが高い（不可能）。
- つまり、血液を用いる臨床検査が確立できれば、肝生検を実施する前に、肝生検を行うべき患者かどうかを判定することができ、極めて有用である。

* 体に針を刺して肝組織を回収する行為

新技術の特徴・従来技術との比較

- HDL中に最も多いタンパク質はapoAIであり、標的として良いと考える。
- 酸化HDL測定の酵素免疫測定法は市販品があるが、NASH鑑別を狙ったものは無い。本技術と同じ酸化修飾apoAIに対する研究は無く、測定系も存在しない。
- 本技術は、診断能を表す指標であるROC-AUCの値が極めて高く、NASH診断に有効と期待させる。

既報のNASH鑑別マーカーとの比較

Scoring system/biomarkers	Methods	ROC-AUC	Ref.
Fucosylated haptoglobin	EIA	0.75	Kamada Y, et al., Hepatology, 2015
LDL-TG	Autoanalyzer	0.78	Our lab
NAFIC score	Ferritin (LTIA) ≥ 200 ng/mL (female) or 300 ng/mL (male) = 1 point IRI (CLIA) ≥ 10.0 IU/mL = 1 point type IV collagen 7S (RIA) = 2 point	0.78-0.85	Sumida Y, et al., J Gastroenterol, 2011
Mac2 binding protein	EIA	0.82	Kamada Y, et al., Hepatol Commun, 2017
Cytokeratin -18	EIA	0.83	Feldstein AE, et al., Hepatology, 2019
Nice model	$5.654 + 3.780E-02 \times \text{ALT (IU/L)} +$ $2.215E-03$ $\times \text{CK18 fragment levels (EIA) (IU/L)}$ $+ 1.825 \times (\text{presence of MetS} = 1)$	0.83	Anty R, et al., Aliment Pharmacol Ther, 2010
LDL-TG/LDL-C	Autoanalyzer	0.86	Our lab
HAIR score	Presence of hypertension 1 point ALT ≥ 40.0 IU/mL 1 point IRI (CLIA) ≥ 5.0 IU/mL 1 point	0.90	Dixon JB, et al., Gastroenterology, 2001
ox-apoAI / Total apoAI	Proteomics (LC-MS/MS)	0.97	本成果

想定される用途1

- 本技術の特徴を研究及び臨床現場で生かすためには、簡便な測定系に落とし込む必要がある。
- 例えば、臨床で既に自動化された測定原理である酵素免疫測定法などに適用することで多検体処理が可能となり、かつ、精度の高い、安定したデータの取得が見込まれる。
- それを研究用/臨床診断補助用に開発・販売する。

想定される用途2

取得できた抗体の用途：

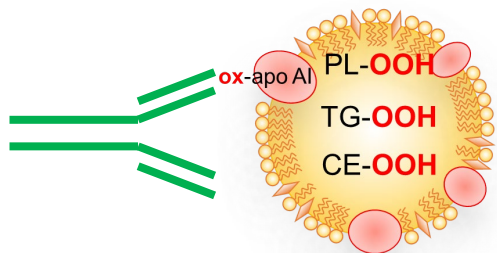
- 脂肪肝に限らず、他の様々な酸化ストレス関連疾患に応用
- イムノブロット
- 免疫組織染色
- フローサイトメトリー
- 抗体医薬

実用化に向けた課題

- ただし、質量分析によって酸化修飾タンパク質を検出する手法については、そもそも臨床現場で質量分析を備えている施設はごく少数であるため、測定原理・機器の選定には改善の余地がある。



- 本技術を酵素免疫測定法に適用する場合、特異的なモノクローナル抗体の開発が伴うが、その点が未解決である。
- 抗体の獲得以降は、実用化に向けて酵素免疫測定法の開発を行い、測定精度や測定の再現性等を確立する。
- 測定法が完成した後は、共同研究先より頂いた臨床検体を測定する予定である。それを見越して倫理審査も通過/延長済みである。



企業への期待

- 未解決の「特異抗体の取得」については、酸化修飾タンパク質あるいはペプチドに対する抗体作製技術によって克服できると考えている。
- 上記の抗体作製技術を持つ企業との共同研究かつまたは酵素免疫学測定系の構築の経験を持つ企業を希望する。
- そのほか、受託依頼による抗体作製を支援くださる企業、測定系の臨床応用を支援くださる企業に興味を持っていたけると幸甚である。

企業への貢献、PRポイント(1)

- 本技術は汎用性の高い酵素免疫測定法に適用可能と考える。産学連携の共同研究を実施して、研究用/臨床診断補助用を開発・販売を目標とする。
- 臨床検体の収集についても、現時点で既に倫理申請を完了している。そのため、酵素免疫測定法が開発した後の評価を連続的に行う計画である。必要な追加実験を行うことでことが可能である。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 非アルコール性脂肪性肝炎の診断方法
- 出願番号 : 特願2020-149798
- 出願人 : 国立大学法人北海道大学
- 発明者 : 櫻井 俊宏、恵 淑萍、千葉 仁志

産学連携の経歴

- 2018年度-現在 食品機能解析・保健栄養学 (渡辺オイスター) 寄附分野・兼務
- 2019年度-現在 日生バイオ株式会社と共同研究
- 2020-2021年度 栄研化学株式会社と共同研究
- 2022年度-現在 富士フイルム株式会社と共同研究
- 2023年度 栄研化学株式会社と共同研究
- 2008年-2009年 日生バイオ株式会社との共同研究内で2023年度ノーステック財団「研究開発助成事業」イノベーション創出研究支援事業 (産学連携創出補助金) に採択

お問い合わせ先

北海道大学 産学・地域協働推進機構
産学協働マネージャー 砂原 一公

産学・地域協働推進機構 ワンストップ窓口
<https://www.mcip.hokudai.ac.jp/about/onestop.html>